

**Erste Erfahrungen
mit einem Neugeborenen-Zweit-Screening im Harn
zur Früherfassung angeborener Anomalien
im Aminosäure-Stoffwechsel**

Marlene Baubin

1976

Aus dem Departement für Neonatologie und angeborene Störungen

Leiter: Prof. Dr. O. Thalhammer

Der Universitätskinderklinik Wien

Direktor: Prof. Dr. H. Asperger

Erste Erfahrungen mit einem Neugeborenen-Zweit-Screening im
Harn zur Früherfassung angeborener Anomalien im Aminosäure-
Stoffwechsel.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marlene Baubin

aus München

1 9 7 6

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. O. Thalhammer, Wien

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke, München

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1976



Inhaltsverzeichnis

A Einleitung

1. Hintergrund der Fragestellung
2. Erklärung der eigenen Fragestellung
3. Allgemeines zur Methodik
4. Methoden und Ergebnisse der Screening-Programme
in Boston (Massachusetts) und New South Wales

B Das Österreichische Programm zur Früherfassung von angeborenen Stoffwechselstörungen

1. Blutscreening
2. Harnscreening
 - a) Methode
 - b) Ergebnisse

C Diskussion

D Zusammenfassung



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A Einleitung

1. Hintergrund der Fragestellung:

Die Diagnosestellung eines Defektes im Aminosäurestoffwechsel muß noch vor dem Auftreten klinischer Symptome erfolgen, da diese bereits Manifestation irreversibler Cerebralschäden wie Schwachsinn, Sprachstörungen oder Krämpfe sein können. Durch frühzeitigen Einsatz von diätetischen Maßnahmen kann man die betroffenen Kinder vor geistiger Retardierung oder sogar Tod in den ersten Lebenswochen bzw. -jahren bewahren.

Es wurden verschiedene Methoden zur Früherfassung von Aminosäurestoffwechsel-Anomalien entwickelt, die alle auf dem vermehrten Auftreten der betreffenden Aminosäuren bzw. deren Metabolite im Blut oder Harn beruhen. Da abnorme Aminosäurekonzentrationen im Blut schon nach Tagen, Metabolite im Harn aber erst nach Wochen auftreten, also zu einer Zeit, in der Neugeborene die Gebärdabteilung schon verlassen haben, beruhen alle Neugeborenen-Primärscreenings aus organisatorischen Gründen auf Methoden zur Blutspiegelmessung, meist auf den verschiedenen Guthrie-Testen. Durch diese Methoden können heute aber naturgemäß nur Störungen erfaßt werden, die zu Blutspiegelerhöhungen führen, nicht aber solche, die nur mit Ausscheidung abnormer Metabolite einhergehen.

2. Erklärung der eigenen Fragestellung:

Screeningmethoden, die auf der Erfassung erhöhter Blutspiegel beruhen, sind seit Jahren mit sehr gutem Erfolg im Einsatz. Die überwiegende Mehrzahl der Screeningzentren benützt den Bakterien-Hemmtest von Guthrie, einzelne Zentren verwenden Papier- oder Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von Aminosäureerhöhungen im Blut. Mit den chromatographischen Methoden läßt sich zwar das gesamte Spektrum der Aminosäuren erfassen, sie liefern aber als Ergebnis eigentlich nur optische Impressionen, die erst durch mitaufgetragene Standards zu halbquantitativen Ergebnissen verarbeitet werden können. Der Guthrie-Test erfaßt zwar nur wenige Aminosäuren - sie sind allerdings die klinisch bedeutungsvollsten - dafür liefert der Test "von selbst" halbquantitative Ergebnisse. Darüber hinaus ist mit dem Guthrie-Test die klinisch sehr bedeutende Galaktose erfaßbar, für die bei Anwendung der chromatographischen Methoden eine eigene (zusätzliche) Zucker-Chromatographie erforderlich wäre.

Unabhängig von der verwendeten Testmethode lassen sich aber nur die Störungen erfassen, die mit erhöhtem Blutspiegel einhergehen, wobei manchmal wegen hoher Zahl falsch positiver Kontrollen die Kontrollspiegel so hoch angesetzt werden müssen, daß einzelne Patienten dem Blutscreening

entgehen können. Ebenso können verschiedene Umstände (verzögerter Fütterungsbeginn, gehäuftes Erbrechen in den ersten Lebenstagen, unzureichende Milchzufuhr) gelegentlich dazu führen, daß die Blutspiegel zum Zeitpunkt der Abnahme für die Blutuntersuchung noch relativ niedrig sind. Diese Überlegungen und die Tatsache, daß sich manche Stoffwechselstörungen überhaupt nicht in Blutspiegelerhöhungen ausdrücken, lassen ein zusätzliches Zweitscreening im Harn für sinnvoll erscheinen.

Die angeborenen, primären Aminoacidurien, denen meist Enzymdefekte zugrunde liegen, kann man nach M.L. Efron (24) in drei Kategorien einteilen:

Aminoacidurie Typ nach EFRON (1, 2)	"Over- flow"	"No- Threshold"	"Renale" (Transport)
Bezeichnungen im Schema	I	II	III
Enzymdefekt	+	+	
Nierenresorptionsstörung		+	
Transportstörung			+
Darmresorptionsstörung			+
Aminosäurekonzentration			
im Harn	stark erhöht	stark erhöht	stark erhöht
im Blut	stark erhöht	normal bis erhöht	normal bis erniedrigt
im Darm			stark erhöht

Tabelle 1 aus: I. Antener (5)

a) Overflow Aminoacidurien: Die vom Defekt betroffenen Aminosäuren und deren Metabolite stauen sich im Blut an, ihre Konzentration im Primärharn ist zu hoch, so daß die maximale Transportkapazität der Tubulusepitelien überschritten wird. Es kommt infolgedessen zu sog. "Überlaufausscheidungen" der betreffenden Aminosäure. Der Aminosäurespiegel ist in Blut und Harn gleichzeitig erhöht. Das ist der Fall bei Erkrankungen wie Phenylketonurie, Ahornsirupkrankheit, Histidinämie oder Tyrosinose.

Die Phenylketonurie geht auf eine Blockierung der Phenylalaninoxidase zurück, die den Schritt von Phenylalanin zu Tyrosin katalysiert. Klinisch zeigen die betroffenen Kinder Symptome wie Imbezillität, Ekzeme und Anfälle. Meist haben sie hellblonde Haare.

Bei der Ahornsirupkrankheit handelt es sich um eine Störung im Abbau von Valin, Leuzin und Isoleuzin durch Insuffizienz einer unspezifischen Decarboxylase. Die erkrankten Kinder sind in der ersten Woche symptomlos; später treten Fütterungsschwierigkeiten, Krämpfe und u.U. Enthirnungsstarre mit Opisthotonus auf. Die meisten Patienten versterben in den ersten Lebenswochen.

Die Histidinämie kommt durch Ausfall der Histidase zustande, die Histidin zur Urocaninsäure desaminiert. Typisches Symptom dieser Erkrankung ist eine Sprachstörung. Daneben gibt es Retardierung und / oder Anfälle.

Ein Teil der Kinder mit Histidinämie ist aber bisher symptomlos.

Die Tyrosinose ist eine Stoffwechselstörung, bei der durch einen Defekt der Para-Hydroxy-Phenylbrenztraubensäureoxydase das Tyrosin nicht in Homogentisinsäure oxidiert werden kann. Die erkrankten Kinder weisen keine cerebralen Schäden auf, aber knotige Lebercirrhose, multiple tubuläre Nierendefekte und Hepatosplenomegalie, verbunden mit Vitamin-D resistenter Rachitis.

- b) No-Threshold-Aminoacidurien: Bestimmte Aminosäuren können wegen eines Enzymdefektes im Nierentubulus nicht rückresorbiert werden. Die Folge ist ein vermehrtes Auftreten der betreffenden Aminosäuren im Harn bei nicht oder nur unwesentlich erhöhten Blutwerten. Klinisch sind diese Störungen meist durch mentale Retardierung und durch neurologische Symptome charakterisiert. Ein Beispiel hierfür wäre die Arginin-Bernsteinsäure-Aminoacidurie.

c) Renale (Transport-) Aminoacidurie: Es gibt verschiedene Transportsysteme für Aminosäuren. Durch Schädigung oder Mangel eines der Transportproteine kann eine bestimmte Aminosäure in der Niere oder im Darm - der Resorptionsmechanismus in Niere und Darm ist der gleiche - nicht resorbiert werden. Die Aminosäure findet sich stark erhöht im Harn, erniedrigt bzw. normal im Serum. Hierfür sind Krankheiten wie Cystinurie, bei der auch Lysin, Arginin und Ornithin, also die basischen Aminosäuren, nicht rückresorbiert werden oder das Hartnup-Syndrom als Beispiele zu nennen. Das Hartnup-Syndrom ist gekennzeichnet durch den partiellen Ausfall des Transportsystems für neutrale Aminosäuren.

.

Aminosäuretransportsysteme und deren Störungen

Aminosäure- transportsystem	Betroffene Aminosäuren	Name der Störung	Betroffene Organe
1. Neutrale Amino- säuren I	Alanin, Serin, Ty- rosin, Phenylalanin (Tryptophan), As- paragin, Glutamin (Leucin, Valin, Isoleucin)	HARTNUP-Syndrom	Niere, Darm
2. Neutrale Amino- säuren II	Methionin (Leucin, Valin, Isoleucin)	Methioninmal- absorption (Oasthouse- disease)	Darm (Niere)
3. Neutrale Amino- säuren III	Tryptophan	Tryptophanmal- absorption (Blue-diaper- disease)	Darm
4. Iminosäuren (zwei ver- schiedene Transport- systeme!)	Glycin, Prolin, Hydroxyprolin (Sarcosin, Betain)	1. Iminoglyzinurie (benigne) 2. JOSEPHS-Syndrom (schwere Form)	Niere Niere (Darm)
5. Saure Aminosäuren	Glutaminsäure, Asparaginsäure	nicht bekannt	
6. Basische Aminosäuren	1. Lysin, Arginin, Ornithin 2. Cystin 3. 1. + 2.	Dibasicamino- aciduria Zystinurie (isoliert) Zystinurie (heterozygot: Zystinlysinurie)	Niere Niere Niere (Darm)

Tabelle 2 aus: Mehnert/Förster: Stoffwechselkrankheiten

Die sekundären Aminoacidurien treten bei einer bereits bestehenden Grundkrankheit, wie z. B. der Zystinose oder dem Fanconi-Syndrom, deren Ursache unbekannt ist, auf.

Neben den angeborenen Aminosäurestoffwechsel-Anomalien gibt es noch zahlreiche andere Ursachen für einen erhöhten Aminosäurespiegel im Harn bzw. Blut:

1. Protein- und Vitaminmangel
2. Glanduläre Malfunktion
3. Lebernekrose
4. Muskeldystrophie
5. Rheumatoide Arthritis
6. Xeroderma Pigmentosum
7. Nierenschaden

(siehe auch Anhang: Tabelle aus A. Saifer (91))

3. Allgemeines zur Methodik:

Welche Methoden bieten sich nun an zur Erkennung von Hyperaminoacidurien? Man kann die Analysen auf 1. mikrobiellem, 2. chemischem, 3. hochspannungselektrophoretischem, 4. chromatographischem Wege durchführen.

- 3.1. Hier sei nun zuerst die sehr bewährte, semiquantitative mikrobielle Methode zur Früherkennung von Aminosäure-

stoffwechsel-Anomalien angeführt, die Guthrie (39) entwickelt hat. Sie beruht allerdings auf dem vermehrten Auftreten von Aminosäuren im Blut, kann daher nur bei Overflow Aminoacidurien eingesetzt werden, da sie zur Aufdeckung von Hyperaminoacidurien über den Weg von Hyperaminoacidämien führt. Die Methode wird seit vielen Jahren von den meisten Screening-Zentren mit bestem Ergebnis verwendet und ermöglicht die Erfassung erhöhter Blutspiegel der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Methionin (Homocystinurie), Histidin, Tyrosin und des klinisch bedeutungsvollen Zuckers Galktose. Mit Hilfe von Antimetaboliten der zu analysierenden Aminosäure, z. B. Phenylalanin, wird der Wachstum des *Bacillus subtilis* gehemmt, solange die Aminosäure Phenylalanin im Blut in normaler Konzentration vorliegt. Blut mit erhöhtem Gehalt dieser Aminosäure, d. h. also Blut von Patienten, die an einer Stoffwechselerkrankung dieser Aminosäure leiden (Hyperphenylalaninämie) hebt diese Hemmwirkung auf. Die Größe des Wachstumshofes um das dem Nährboden zugefügte Blutblättchen korreliert mit dem Aminosäuregehalt des Blutes (9). Da es sich hierbei um Blutanalysen handelt, erfaßt dieser Test eine Reihe von Aminosäure-Stoffwechselstörungen nicht, nämlich all die Anomalien, die nicht unbedingt erhöhte Blutspiegel aufweisen, sondern vorwiegend durch abnorme Aminosäureausscheidung gekennzeichnet sind, z. B. Cystathioninurie, Homocystinurie, tubuläres

Syndrom, und Hartnup-Syndrom sowie Cystinurie.

Bei der Cystathioninurie wird durch eingeschränkte Funktion der Cystathionase der Abbau von Homocystein zu Cystin gestört. Es kommt dadurch zu geistiger Retardierung, Thrombocytopenie etc.. Die Behandlung mit Vitamin-B 6 ist sehr erfolgreich.

Der Homocystinurie liegt das Fehlen der Cystathioninsynthetase in der Leber zugrunde, so daß aus Serin und Homocystein kein Cystathionin gebildet werden kann. Klinische Folgen sind Cerebralschäden, dislocierte Augenlinsen, generalisierte Osteoporose etc.. Homocystin kann allerdings auf Grund des erhöhten Methioninspiegels mit dem Guthrie-Test gefunden werden.

3. 2. Für die chemischen Methoden wurden bisher nach Stuber (107) die folgenden Tests als Beispiele ausgearbeitet:

a) Ferrichloridtest:

Nachweis von Phenyl- oder Imidazolbrenztraubensäure

Reagenz: $1,0 \text{ g FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$1,0 \text{ g Fe (NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$100 \text{ ml } 0,02 \text{ n HCl}$

Durchführung: $1,0 \text{ ml Reagenz} + 10 \text{ Tropfen Urin}$ 2 - 5 Minuten mischen. Dunkelgrüne Färbung kennzeichnet ein positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei Phenylketonurie und Histidinämie.

b) DNPH-Test:

Nachweis von Ketosäuren

Reagens: 1,5 g 2,4 Dinitrophenylhydrazin in 400 ml Methanol

100 ml 6n HCl

Durchführung: 10 ml acetonfreier Harn + 3 Tropfen Reagens. Schütteln. Gelbes Präzipitat nach einer halben Stunde kennzeichnet ein positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei Phenylketonurie, Leucinose, Histidinämie und Tyrosinose.

c) Nitrosonaphtholtest:

Nachweis von Tyrosin und Abbauprodukten

Reagens: 1) 2,64 n HNO_3

2) 2,5 g Natriumnitrit in 100 ml dest. H_2O

3) 100 mg 1-Nitroso-2-Naphthol in 100 ml 96 %igem Äthanol

Durchführung: 1,0 ml Reagens 1 + 1 Tropfen Reagens 2 + 0,1 ml Reagens 3. Schütteln. 3 Tropfen Harn zugeben. Orangefärbung nach 2-5 Minuten kennzeichnet ein positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei Tyrosinämie.

d) Cyanid-Nitroprussidtest:

Nachweis von S-haltigen Aminosäuren

Reagens: 1) 5,0 g NaCN in 100 ml dest. H_2O

2) 5,0 g Natriumnitroprussid in 100 ml dest. H_2O

Durchführung: 1,0 ml Urin + 0,4 ml Reagens 1 schütteln, nach 5 Minuten einen Tropfen Reagens 2 dazugeben. Sofortige Purpurfärbung kennzeichnet ein positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei Homocystinurie und Cystinurie.

e) Ninhydrintest:

Nachweis von Aminosäuren

Reagens: 1,0 ml Ninhydrin + 500 ml 96%igem Äthanol

Durchführung: 1,0 ml Reagens + 3 Tropfen Harn

2 - 5 Minuten mischen. Violettfärbung kennzeichnet ein positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei vermehrter Ausscheidung einer oder mehrerer Aminosäuren.

f) Benedicttest:

Nachweis reduzierter Substanzen

Reagens: 1) 17,3 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O

2) 173 g Natriumcitrat + 100 g Natriumcarbonat in 700 ml kochendem Wasser gelöst. Langsam Reagens 1 zuführen und bis auf 1000 ml auffüllen.

Durchführung: 1,0 ml Reagens + 3 Tropfen Harn 5 Minuten schütteln im kochenden Wasserbad. Grünlich-gelbe Färbung kennzeichnet ein positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei Zuckerausscheidung (Galktosämie, hereditäre Fruktoseintoleranz).

g) Berrytest:

Nachweis von Mucopolysacchariden

Reagens: 0,04 %iges Toluidin-Blau auf pH = 2,0 gepuffert.

Durchführung: 0,1 ml Urin auf Filterpapier getrocknet,
eine Minute in das Reagens getaucht, in Äthanol gewaschen.

Ein Purpurfleck auf blauem Hintergrund kennzeichnet ein
positives Ergebnis. Der Test ist positiv bei Mucopoly-
saccharidosen.

Bei der Anwendung dieser Tests mit Harnproben von 336 verdächtigen Patienten (Stuber 107) erwiesen sich der Ninhydrin- und der Benedicttest als die ergiebigsten dieser chemischen Methoden, während bei dem Berrytest und dem DNPH-Test keine der Proben ein positives Ergebnis lieferte.

Aus verschiedenen Gründen haben sich diese chemischen Methoden für ein Massenscreening nicht bewährt:

1. sie liefern nur grob qualitative Ergebnisse,
2. zu ihrer Durchführung ist flüssiger Harn erforderlich, was zur Folge hat, daß nur ein ausgewähltes Patientengut den Tests zugänglich ist (z.B. stationär aufgenommene Patienten).
3. sie erfassen nur ein begrenztes Aminosäurespektrum.

3.3. Wie I. Antener (5) ausführt, hat sich bei ihren Untersuchungen die Elektrophorese aus folgenden Gründen als sehr vorteilhaft erwiesen:

- a) es ist keine Entsalzung des Harns nötig, die Trennungen sind scharf, die Durchführbarkeit ist rasch.
- b) Es können mehrere Harn-, Serum- und Stuhlproben nebeneinander untersucht werden. Genetische Studien können bei einer ganzen Familie in einem Lauf ausgeführt werden. Die Behandlung kann während längerer Zeit verfolgt werden. Nachteil ist der hohe Anschaffungspreis der erforderlichen Geräte, sowie die Tatsache, daß viele Aminosäuren nur gruppenweise aufgetrennt werden und Zahlenangaben nur mit Hilfe eines Integralschreibers zu treffen sind (70).

3.4. Sehr differenzierte Ergebnisse liefern die chromatographischen Methoden, die Dünnschicht-, Papier- und Gaschromatographie. Ihr großer Vorteil lag darin zu sehen, daß fast alle Aminosäuren in einem Testvorgang erfasst sind. Außerdem kann man auf Filterpapier getrockneten Harn verarbeiten, so daß zwei wesentliche Forderungen für einen Massenscreeningsteat erfüllt werden:

- a) leichte Versendbarkeit der Proben
- b) gute chemische Stabilität der im Harn enthaltenen Aminosäuren. Aminosäuren sind nämlich im getrockneten Zustand wesentlich länger stabil, als in Flüssigkeit. Zudem fehlt die Möglichkeit von bakteriellen Abgängen, der sowohl zu falschen negativen Ergebnissen bei Abgängen der gesuchten Substanz, als auch zu falschen posi-

tiven Ergebnissen bei Entstehung neuer Substanzen führen kann.

Für screeningmäßige Untersuchungen erfordert die Säulenchromatographie einen zu umfangreichen Arbeits-, Material- und Zeitaufwand. Sie ist unabhängig von Bezugsgrößen und inneren Standards. Man greift nur in Fällen auf diese Methode zurück, in denen man quantitativ exakte Ergebnisse wissen muß. Indikationen zur Anwendung der Säulenchromatographie im klinischen Labor sind nach Lutz (70) :

- a) Überwachung der halbquantitativen Verfahren
- b) Bestätigung von aus Suchtestergebnissen vermuteten Störungen des Aminosäurestoffwechsels
- c) Identifizierung von unbekannten ninhydrinpositiven Substanzen
- d) Clearance-Bestimmung
- e) Belastungstests, z.B. zur Differenzierung von Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie
- f) Überwachung diätetischer Einstellung mit neuentwickelten Präparaten
- g) Heterozygotentests
- h) Bestimmung der freien Aminosäuren in Fibroblasten
- i) Untersuchung der Wirksamkeit von STH bei Zwergwuchs.

Als chromatographische Methoden für ein Massenscreening kommen die Papier- und die Dünnschichtchromatographie in Frage. Am häufigsten wurde bisher die Papierchromatographie

durchgeführt:

Aus mit Harn getränkten Filterpapierkärtchen werden kleine Plättchen (ca. 5 mm Durchmesser) ausgestanzt und in gleich große Löcher eines Whatman-Papiers Nr.1 eingelegt. Als Laufmittel verwendet man ein Gemisch aus 120 ml n-Butanol, 30 ml Eisessig und 50 ml Wasser. Die Färbung erfolgt, nachdem das Whatman-Papier getrocknet ist, mit Ninhydrin bzw. Pauly's Reagens für Histidin und dessen Metabolite. Vorteil dieser Methode ist ihre billige und einfache Durchführbarkeit: man kann auf einem Bogen Whatman-Papier 20 eindimensionale- und nur solche kommen für ein Massenscreening in Frage-Urinproben verarbeiten. Nachteilig ist die relativ lange Laufzeit von ca. 8 Stunden und die unbefriedigende Auftrennung von Valin und Methionin bzw. Glyzin und Serin. (91).

Auf die Methode der Dünnschichtchromatographie soll in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen werden.

4. Methoden und Ergebnisse der Screening-Programme in Massachusetts und New South Wales:

Vor Beginn des Harnscreenings im Rahmen des Österreichischen Programmes hat man bereits in zwei großen Screening-Zentren ein routinemäßiges Harn-Massenscreening betrieben. Es sind dies New South Wales in Australien (119, 125) und Boston (Programm von Massachusetts: 67). Beide erfas-

sen Neugeborenen zahlen, die etwa den österreichischen entsprechen, überblicken aber auf Grund von jahrelangen Beobachtungen schon Zahlen von 300 000 bzw. 500 000. Harn wird mit 4-6 Wochen auf Filterpapier gesammelt, der Nachweis geschieht in den erwähnten Zentren mit Papierchromatographie.

Die Ergebnisse der beiden Zentren sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	Massachusetts	New South Wales
Total	222.302	200.000
Cystin-Lysinurie	"viele"	343
Cystinurie komplett	16	47
Histidinämie	14	9
Iminoglycinurie	13	
Prolinurie		13
Prolinaemie		7
Hartnup-Syndrom	14	2
Hyperglycinaemie	2	
Glycinurie		4
Argininb. Schwachsinn	1	0
Ornithinaemie	1	0
Lysinaemie	1	0
Fanconi-Syndrom	1	0
Hydroxyprolinurie	0	1
Tyrosinurie	0	2
Cystationinurie	0	2

Tabelle 3

Am häufigsten gefunden wird in beiden Zentren die Cystinurie, die in verschiedenen Formen auftreten kann:

Typ I : die aktive Resorption von Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin im Darm fehlt fast völlig.

Typ II : der Cystintransport im Darm ist noch möglich, jedoch quantitativ stark eingeschränkt.

Typ III : auch Arginin und Lysin können, stark eingeschränkt, noch resorbiert werden.

Bei einer Auswertung von 100 kompletten Cystinurien, bei denen also neben Cystin auch Lysin, Arginin und Ornithin ausgeschieden wird, haben sich bei 20 Steinleiden und/oder Infektionen der ableitenden Harnwege gefunden (120). Relativ häufig ist auch noch die Iminoglycinurie vorgekommen mit Erhöhung von Prolin, Hydroxy-Prolin und Glycin oder isoliert die Prolinurie. Bei der Iminoglycinurie ist die tubuläre Rückresorption von Prolin, Hydroxy-Prolin und Glycin gestört, die vermutlich ein gemeinsames Transportsystem benutzen. Wesentliche Symptome werden nicht beobachtet.

Histidinämie wird ebenfalls in beiden Zentren recht oft gefunden, im Österreichischen Programm aber durch den Guthrie-Test schon im Neugeborenenalter erfaßt (113).

Im Massachusetts-Programm ist häufig das Hartnup-Syndrom aufgefallen, das durch eine Resorptionsstörung von Aminosäuren hervorgerufen wird. Es geht mit pellagraartigen Hautveränderungen, psychomotorischer Retardation und Ataxie

einher und kann therapeutisch mit Antibiotika und Vitamin-B (Nikotinsäure) angegangen werden.

Die übrigen Störungen scheinen sehr selten zu sein.

B Das Österreichische Programm zur Früherfassung von angeborenen Stoffwechselstörungen

1. Blutscreening

Seit 1966 besteht in Österreich ein Screeningprogramm für angeborene Stoffwechselstörungen, das in Wien begonnen, dann aber rasch auf das ganze österreichische Bundesgebiet mit Ausnahme von Tirol ausgedehnt wurde (114). Dazu wird bei allen Neugeborenen Blut zwischen dem 4. und 6. Lebenstag abgenommen und auf Filterpapier getrocknet an das Department für Neonatologie und angeborene Störungen der Universität Wien eingeschickt. Die Untersuchung erfolgt mit dem Bakterien-Hemmtest nach Guthrie, erfaßt werden mit Phenylalanin, Leucin, Histidin und Methionin die klinisch bedeutungsvollsten Aminosäuren, zusätzlich beide Formen der Galaktosämie und seit 1973 mit einem Enzymtest auch Arginin-Bernsteinsäure-Schwachsinn.

Der Abnahmetag zwischen dem 4. und 6. Tag ist deswegen am günstigsten, weil er einerseits spät genug ist, um schon zu einer Anhäufung der gesuchten Substanz im Blut zu führen und andererseits zeitig genug, um auch perakut ver-

laufende Erkrankungen wie Leucinose oder Galaktosämie durch Transferasemangel, bei denen die Kinder schon in der zweiten Lebenswoche versterben können, noch rechtzeitig zu erfassen.

2. Eigene Untersuchungen im Rahmen des österreichischen Programmes: Harnscreening

Wie bereits ausgeführt wurde, gibt es Erkrankungen, die durch ein Neugeborenen-Blutscreening nicht erfaßt werden können bzw. seltene Aminosäure-Stoffwechselstörungen, für die es keine Guthrie-Tests gibt. Daher hat man sich im Herbst 1972 in Wien entschlossen, zur Erweiterung des Programmes ein routinemäßiges Massenscreening auf abnorme Aminosäureausscheidungen einzuarbeiten. Es lagen bereits die oben erwähnten Ergebnisse der zwei großen Screening-Zentren in Massachusetts und New South Wales vor.

a) Methode

Tippett (117) hat 1972 vier verschiedene Techniken (auf- und absteigende Papierchromatographie, Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie) hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeiten für Massenscreening untersucht. Dabei zeigte zwar die Hochspannungselektrophorese die höchste Empfindlichkeit, aber die Dünnschichtchromatographie hat sich als die geeignetste Methode für ein Massenscreening

erwiesen.

Auch wir haben uns nach Vergleich von Papier- und Dünnschichtchromatographie entschlossen, unser Screeningprogramm mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie durchzuführen und dazu folgende Technik entwickelt: auf eine Glasleiste wird ein doppelseitig klebender Papierstreifen (doppelseitiges Celluloseklebeband DA 170) angebracht, der einerseits mit den aus 20 Harnkärtchen gestanzten Plättchen (Durchmesser ca. 5 mm) belegt wird. Die Glasleiste wird nun mit einem Gummiband so auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (DC Fertigplatte mikrokrokristalliner Cellulose, Schichtdicke 0,1 mm, der Firma Merck, Darmstadt) befestigt, daß die Harnplättchen direkten Kontakt zur Beschichtung der Platte haben. In einem Tank, der 3 mm hoch mit 70 %igem Äthanol gefüllt ist, wird das System kurz, ca. 30-60 Sekunden, zur Übertragung der Aminosäuren auf die Dünnschichtplatten eingetaucht. Nach 10 Minuten, d.h. nachdem das Gemisch etwa 5 mm an der Dünnschichtplatte hochgestiegen ist und genügend Aminosäuren auf die Dünnschichtplatten übertragen sind, entfernt man die Glasleiste mit den Harnproben und läßt die Platten trocknen. Nun erfolgt die Aufteilung der Aminosäuren durch Zweifachentwicklung in einem Gemisch aus Butanol-Aceton-Eisessig und Wasser (35:35:10:20). Die Laufhöhe beträgt 9 cm, die Dauer etwa eine Stunde pro Lauf. Zur Färbung verwenden wir folgende Methoden:

aa) Ninhydrin: die Anfärbung geschieht durch Besprühen

mit einer 0,2 %igen alkoholischen Ninhydrinlösung oder einfacher durch Zugabe von Ninhydrin in derselben (0,2 %ig) Konzentration zum Laufmittel für den zweiten Lauf. Ninhydrin hat eine sehr niedrige Nachweisgrenze, färbt aber praktisch alle Aminosäuren nur in einer Farbe, nämlich violett, an.

bb) Folin-Reagens: die trockenen Platten werden mit folgender Lösung besprüht

0,2 g Naphthochinonsaures Natrium und
100,0 ml 5 %ige NaHCO_3 Lösung

Das Reagens muß frisch zubereitet werden. Folin-Reagens ist im allgemeinen wesentlich weniger empfindlich als Ninhydrin, ermöglicht aber bessere farbliche Differenzierung der Aminosäuren. So unterscheidet es z.B. die bei eindimensionaler Auftrennung an der gleichen Stelle liegenden Aminosäuren durch Farbdifferenzierung, beispielsweise wird Lysin blau, Histidin braun angefärbt. Gegenüber den Iminosäuren Prolin und Hydroxy-Prolin (beide erscheinen als rosa Flecke) reagiert Folin empfindlicher als Ninhydrin.

Es bestehen lt. A. Saifer (91) noch 24 weitere Färbemöglichkeiten, die z.T. nur einzelne Aminosäuren anfärben und somit nur für spezielle Fragestellungen angewandt werden können. Es soll hier im einzelnen nicht darauf eingegangen werden.

Wegen der Vorteile der Dünnschichtchromatographie gegenüber der Papierchromatographie (rascherer Lauf, größere Trennschärfe, höhere Empfindlichkeit) bei etwa gleichen Kosten beider Methoden hat man in Wien die Dünnschichtchromatographie als Nachweismethode vorgezogen. Nachdem durch ausgedehnte Versuche gesichert war, daß die Dünnschichtchromatographie der Papierchromatographie auch bei Anwendung als Massensuchtest zumindest gleichwertig war, wurde Anfang 1973 eine vorläufige Studie in den Bundesländern Wien, Niederösterreich und Burgenland gestartet. Die Beteiligung, die ja ausschließlich von der Mitarbeit der Mütter abhängt, ist mit 52,4 % so gut gewesen, daß das Harnscreening Anfang 1974 auf das ganze Bundesgebiet, allerdings wieder ohne Tirol, ausgedehnt werden konnte. Die Mittel für diese Untersuchungen wurden vom österreichischen Bundesministerium für Gesundheit und Umweltschutz zur Verfügung gestellt.

Das Sammeln der Proben ist einfach: von der entbindenden Stelle erhält jede Mutter ein Filterpapierkärtchen mit Schutzhülle, ein rosa Kuvert mit vorgedruckter Adresse und einen erläuternden Brief, der für Gastarbeitermütter auch in Serbo-kroatisch abgefaßt ist. 4 Wochen nach der Geburt wird das Filterpapier durch Anpressen an eine nasse Windel, die aber nicht mit Stuhl verunreinigt sein darf, mit Harn getränkt. Verunreinigungen mit Stuhl führen wegen der im Stuhl enthaltenen Aminosäuren zu abnormen Bildern -

meist ergibt sich das Bild der generalisierten Hyperaminoacidurie-, die aber selbst bei makroskopisch sichtbaren Stuhlbeimengungen kontrolliert werden müssen, da sie eine isolierte abnorme Ausscheidung verdecken können. Außerdem sollen die getesteten Kinder nicht mit Antibiotika bzw. Antikonvulsiva vorbehandelt sein bzw. soll die Verabreichung von Antibiotika oder Antikonvulsiva der Untersuchungsstelle bekannt gegeben werden. Antibiotika können positive Testergebnisse vortäuschen, durch Antikonvulsiva (Primidon, Phenylhydantoin, Diphenylhydantoin, Ethosuximid und/oder Phenobarbitursäure) steigt die Aminosäureausscheidung deutlich an (76) :

Beeinflussung von Suchtests für angeborene Stoffwechselerkrankungen durch Antibiotika und Antikonvulsiva			
	Antibiotika	Antikonvulsiva	
		direkt	durch Hyperaminoacidurie
Guthrie-Test	Hemmung	Ø(?)	-
Plasma-DC	Ø	Ø	-
Urin:Ninhydrin-Test	positiv	Ø	positiv
Urin:TNBS-Test	Ø	Ø	positiv
Urin:Zweidimens.DC	Ø	Ø	positiv

Tabelle 4 aus Mönch (76)

(TNBS-Test ist ein halbautomatischer Screeningtest zur Suche von Hyperaminoacidurie, bei dem als Farbreagens 2,4,6 - Trinitrobenzolsulfonsäure verwendet wird.)

Nach dem Trocknen wird das Filterpapierkärtchen in dem rosa Kuvert an das Wiener Labor eingesandt. Der Mutter erwachsen keinerlei Kosten, das Porto wird im Rahmen des österreichischen Programmes gezahlt. Die rosa Farbe des Kuverts dient dem raschen Trennen des großen Posteinlaufs (Blut- und Harnscreening) der beiden Programme.

Zur Durchführung der Dünnschichtchromatographie werden von jeder Harnprobe jeweils zwei Dünnschichtchromatographien angefertigt, die in den zwei sich ergänzenden Methoden mit Ninhydrin und Folin-Reagens gefärbt werden. Ein drittes aus den Harnkärtchen gestanztes Plättchen kommt auf eine Tüpfelplatte und wird einem qualitativen chemischen Test für schwefelhaltige Aminosäuren unterzogen. Bei Vorliegen größerer Mengen von Cystin oder Homocystin kommt es nach Zugabe von Natriumcyanid und Nitroprussid zu einer rosa Färbung.

Verdächtige Proben werden nach Maßgabe der Dringlichkeit der gefundenen Aminosäureerhöhung weiter verfolgt. Bei Krankheiten, die möglicherweise rasch zu Schädigungen führen, werden Sofortkontrollen angefordert, bei anderen erst nach vier Wochen. Dadurch soll erreicht werden, daß vorübergehend erhöhte Aminosäureausscheidungen bereits abgeklungen sind, die durch Unreife der individual- bzw. gruppenspezifischen Transportsysteme an den Tubulusemembranen bedingt sind. Typische Muster solcher physiologischen Hyperaminoacidurien im Säuglingsalter sind er-

höhte Werte für Threonin, Serin, Prolin, Glycin, Alanin und Histidin (3).

Zum Sammeln der Kontrollen erhält jede Mutter neuerlich ein rosa Kuvert mit Filterpapierkärtchen, eine Anleitung zu Harngewinnung und Versand, sowie einen die Kontrolle erklärenden Brief. Das rosa Kuvert und das Kärtchen sind besonders gekennzeichnet, damit es verlässlich von den Ersteinsendungen abgesondert werden kann.

Da unreife-bedingte Erhöhungen relativ häufig sind (ca. 2%), müssen viele Eltern beunruhigt werden. Diese Eltern erhalten auf jeden Fall, d.h. auch bei negativem Ausgang, eine Verständigung vom Ausgang der Kontrolluntersuchung. Das weitere Vorgehen bei länger dauernden abnormen Ausscheidungen richtet sich nach der Art der gefundenen Störung.

b) Ergebnisse

Es wurden bisher mit der eben dargestellten Methode 30 540 Säuglinge untersucht; die Ergebnisse der ersten 20 000 sind in Tabelle 5 aufgeschlüsselt. Die "Verdächtigen" aus 10 000 Erstuntersuchungen stehen noch unter Kontrolle. Insgesamt waren 395 Proben primär auffällig. Am weitaus häufigsten war das Cystin-Lysin-Ornithin-Muster und die generalisierte Hyperaminoacidurie. Cystin-Lysin-Ornithin stellte auch die meisten tatsächlich gefundenen Störungen. Allerdings handelte es sich hier um

inkomplette Formen der Cystinurie, die nach den bisher gesammelten Erfahrungen so gut wie nie zu Komplikationen führen.

Ergebnisse von 20 000 Routine-Harnscreeninguntersuchungen

Erhöhung	1. Test	Bestätigt	Störung
Cys-Lys	78	23	Cystinurie (inkomplett)
General. As-Aussch.	112	0	
Pro-Gly-OH-Pro	68	0	
Pro	24	4	Prolinurie
Lys	42	0	
p-oHppa (Tyr-Metab.)	21	0	
Tau	6	0	
His	6	1	Histidinämie
Ser	5	0	
Verschiedene	11	0	
Leu, Tyr, OH-Pro, Ala			
Gly, Sar, Glu, Val			
nicht sicher identifiziert	16	0	
Antibiotika	6	0	
	395	28	

Tabelle 5

Das Muster der generalisierten Hyperaminoacidurie ist sicher in vielen Fällen durch Stuhlbeimengungen verursacht. Bisher waren alle Säuglinge bei der Kontrolle normal. Iminoglycinurie ist ebenso wie die Ausscheidung von Tyrosinmetaboliten ein typisches Unreifezeichen, kann aber

auch Ausdruck einer echten Stoffwechselstörung sein. Alle bisher kontrollierten Kinder erwiesen sich als normal. Unter 31 Kindern mit primär erhöhter Prolinausscheidung wurden 4 Hyperprolinurien gefunden. Die Blutspiegel dieser Kinder waren allerdings normal. Diese Kinder werden in Übereinstimmung mit den beiden anderen Zentren in New South Wales und Massachusetts auf normaler Kost belassen, sie werden aber regelmäßig kontrolliert. Bisher haben sie sich völlig normal entwickelt.

Bei einem von 6 Kindern mit anfänglich erhöhter Histidinausscheidung konnte enzymatisch und durch Belastungstests die Diagnose Histidinämie gestellt werden. Es ist das einzige Kind, das nicht mit dem Guthrie-Test erfaßt wurde, da im Neugeborenenalter der Blutspiegel unter der Grenze für "Verdächtige" lag. 4 Kinder waren bei der Kontrolle normal, eines steht noch unter Kontrolle. Das Harnscreening stellt also eine gewünschte Kontrolle des Blutscreenings dar. Es ist daher zu erwähnen, daß kein anderer Fall einer Aminosäurestoffwechselstörung gefunden wurde, der dem Blutscreening entgangen wäre.

Alle Kinder mit einer isolierten Lysin-Ausscheidung hatten ebenso wie die Kinder mit anderen seltenen Erhöhungen im zweiten kontrollierenden Test ein normales Ergebnis. Es handelte sich hier also offenbar um unreife-bedingte vorübergehend erhöhte Ausscheidungen.

C Diskussion

Man hat sich im österreichischen Programm zur Dünnschichtchromatographie als Methode des Harnscreenings entschieden, nachdem man zu Beginn eine kleinere Testserie mit Papierchromatographie parallellaufen ließ. Es ergab sich bei diesem Vergleich, daß die Dünnschichtchromatographie aus folgenden Gründen die Überlegene Methode war:

1. Der Zeitaufwand der Dünnschichtchromatographie ist sehr gering, was durch die rasche Laufgeschwindigkeit bedingt ist. Man kann zudem pro Tag eine hohe Probenzahl bewältigen, da in einem Tank mühelos bis zu 14 Platten mit je 20 Tests, das sind immerhin insgesamt 280 Tests pro Tank, verarbeitet werden können.
2. Die Auftrennung der einzelnen Aminosäuren gelingt bei der Dünnschichtchromatographie exakter als bei der Papierchromatographie, insbesondere wenn man sich der zwei sich ergänzenden Färbungen Ninhydrin und Folin-Reagens bedient. Die Nachweisgrenze liegt durch die höhere Empfindlichkeit der Dünnschichtchromatographie niedriger als bei der Papierchromatographie.
3. Was den Materialaufwand betrifft, so ist er bei beiden Methoden ungefähr gleich gering. Der finanzielle Aufwand für die Erstausrüstung sowie für die laufenden Kosten steht in vertretbarem Verhältnis zum Nutzen des Screenings. Es ist vielleicht zu erwähnen, daß bei

der Papierchromatographie nur jeweils ein Bogen Whatman-Papier (mit je 20 Harntests) pro Tank zu verwerten ist, so daß die Papierchromatographie möglicherweise etwas teurer kommt.

4. Geschultes Personal ist weder für die Papier- noch für die Dünnschichtchromatographie erforderlich.

Sowohl in Massachusetts, als auch in New South Wales, also in beiden Zentren, die zur Erweiterung des österreichischen Programmes zur Früherfassung angeborener Stoffwechselstörungen angeregt haben, wird das Harnscreening neben dem Blutscreening nach Guthrie eingesetzt. Der bereits jahrelang bewährte Guthrie-Test, der zuverlässig zahlenmäßig leicht meßbare und quantifizierbare Ergebnisse liefert, hat zwei "Schönheitsfehler":

1. Eine Blutprobe kann nur jeweils auf das Vorhandensein einer Aminosäure pro Test untersucht werden. Man hat entsprechend der Häufigkeit und klinischen Bedeutung der vorkommenden Stoffwechselstörungen Guthrie-Tests auf Phenylalanin, Leucin, Histidin, Methionin, Tyrosin, Arginin-Bernsteinsäure und Galaktose eingearbeitet. Es besteht also die Möglichkeit, daß seltene Stoffwechselanomalien beim Guthrie-Test übersehen werden. Dem gegenüber erfaßt die Chromatographie das gesamte Aminosäure-Spektrum in einem Arbeitsgang, erzielt aber wegen der visuellen Auswertung nur relative Eindrücke, keine exakten Ergebnisse.

In einzelnen Screening-Zentren wird oder wurde aus diesen Überlegungen heraus die Chromatographie als Nachweismethode für Hyperaminoacidämien gewählt (z.B. Komrower in Manchester, Scriver in Montreal, Ireland in Liverpool). Der theoretische Vorteil gegenüber dem Guthrie-Test scheint uns durch praktische Nachteile (optischer Eindruck statt meßbarem Bakterienwachstum, häufige Kontrollen) bei Verwendung zu Massenscreening fraglich. Wir haben bei 25 000 Neugeborenen Vergleichsuntersuchungen unter Screeningbedingungen durchgeführt. Dabei fanden wir eine gute Übereinstimmung für die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Tyrosin, mäßige für Methionin (das bei eindimensionaler Trennung von dem wesentlich höher konzentriert vorhandenen Valin überlagert wird) und so gut wie keine für Histidin. Unter 100 000 getesteten Neugeborenen wurde bisher in der Dünnschichtchromatographie keine Störung gefunden, die nicht auch mit dem Guthrie-Test gefunden worden wäre.

2. Es gibt eine Reihe von Aminosäurestoffwechselstörungen, die nicht unbedingt mit einer Blutspiegelerhöhung einhergehen oder für die es keinen Guthrie-Test gibt. Sie können bei einem Blutscreening nach Guthrie also nicht erfaßt werden (z.B. Cystinurie, Glycinurie, Hartnup-Krankheit). In einem Fall einer Histidinämie hat sich gezeigt, daß der Guthrie-Test auch u.U. zu früh durchgeführt wird, um auffällige Blutspiegel, die sich

erst in der zweiten Lebenswoche oder später entwickeln, festzustellen. Es stellt also das Harn-Zweit-Screening eine sinnvolle Ergänzung, keinesfalls aber einen Ersatz des Neugeborenen-Blutscreenings dar.

D Zusammenfassung

Im Rahmen des österreichischen Programmes zur Früherfassung von angeborenen Stoffwechselstörungen wurde als Ergänzung zu dem seit 1966 bestehenden Neugeborenen-Blutscreening nach Guthrie im Herbst 1972 ein Neugeborenen-Zweit-Screening mit Harn durchgeführt. Das Harnscreening ist als Ergänzung zum Blutscreening sinnvoll, da mit letzterem nicht alle Aminosäurestoffwechselanomalien erfaßt werden können. Das Ergebnis von 20 000 vorliegenden Routine-Harnscreening-Untersuchungen ergab 23 Fälle inkompletter Cystinurie, 4 Kinder mit Prolinurie und eines, das an Histidinämie erkrankt war.

Aufbau und Methode dieses Screening-Programmes haben sich aufgrund der gesammelten Erfahrungen als richtig erwiesen, und die Mitarbeit der Mütter ist befriedigend. Sie wird sicher noch erheblich zunehmen, wenn das Programm länger durchgeführt wird.

Daß noch keine ernsten Erkrankungen gefunden wurden, ist bei ihrer Seltenheit nicht weiter verwunderlich.

Literaturverzeichnis

1. Adriaenssens K.

Simplification of chromatographic techniques for screening of inborn errors of metabolism by use of an appropriate chromatographic elution solvent.

Monogr. Hum. Genet. 6:142

1972

2. Andersen H.E. et al.

The Vodskov Project: Thin layer chromatography of amino acids in urine from mentally retarded patients.

III. Methodology of the investigation

Danish Med. Bull. 16:235-8

Sept. 1969

IV. Normal material and primary screening

Danish Med. Bull. 16:239-42

Sept. 1969

V. Repeat investigations of the cases of aminoaciduria found in the primary investigation

Danish Med. Bull. 17:1-7

Jan. 1970

3. Ando T. et al.

A simple screening method for detecting isovalerylglycine in urine of patients with isovaleric acidemia.

Clin. Chem. 16:420-2

May 1970

4. Ansorge S. et al.

Quantitative paper chromatography aminoacid determination. Standardization of the procedure and method of testing new paper types.

Pharmazie 22:420-2

Oct. 1967

5. Antener I.

Biochemical studies on inherited disorders of amino-acid metabolism in pediatrics.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7:427-39

Sept. 1970

6. Antener I. et al.

Hartnup disease (author's transl.)

Monatsschr. Kinderheilkd. 121: 571-83

Sept. 1973

7. Bélanger M. et al.

A system of early screening for inborn errors of metabolism: methods and results for hereditary tyrosinemia.

Union Med. Can. 102: 294-304

Feb. 1973

8. Berry H.K.

Evaluation of a simple thin layer chromatographic screening test for amino acid abnormalities.

J. Chromatogr. 56: 316-20

Apr. 1971

9. Bickel H. et al.

Early detection of hereditary enzyme defects of amino acid metabolism by means of microbiological inhibitor tests and thin layer chromatography.

Z. Klin. Chem.: 203-4

Mar. 1969

10. Brante G.

Aminoacidopathies in mental retardation.

Monogr. Hum. Genet. 6: 146-7

1972

11. Bremer H.J.

Thin layer chromatography of urinary amino acids.

Klin. Wochenschr. 48: 682-688

Jun. 1970

12. Bremer H.J.

Methods of thin layer chromatography for the identification of aminoaciduria, aminoacidemia and galactosemia.

Monatsschr. Kinderheilkd. 117: 32-37

Jan. 1969

13. Brodehl J.

Physiological and pathological aminoacidurias

Monatsschr. Kinderheilkd. 121:190-200

May 1973

14. Brodehl J.

Aminoaciduria and hyperaminoaciduria in childhood

Clin. Nephrol. 1:149-68

May-Jun. 1973

15. Castets J.C. et al.

Screening for amino acid diseases: column chromatography
of amino acids from a paper sampling.

Arch. Fr. Pediatr. 29:675-6

Jun-Jul. 1972

16. Coignet J. et al.

a propos of a case of cystathioninuria with excretion
of homocystine

Pediatric 26:317-22

Apr.-May 1971

17. Columbo J.P.

Early detection of inborn errors of metabolism in
Switzerland: the problems of hyperphenylalaninemia
(author's transl.)

Ther Umsch. 31:545-52

Aug. 1974

18. Crosby P.F.

Mental retardation due to inborn errors of amino acid
metabolism in Puerto Rico. Results of an screening test
and review of other documented cases.

Bol. Assoc. Med. PR 63:184-6

Jul. 1971

19. Curtis H.T. et al.

Use of Toluidine Blue for sequential staining of
urinary amino acid chromatograms.

J. Chromatogr. 57:165-6

Apr. 1971

20. Davis J.R.

Reliability of urinary delta-aminolevuline acid as a
mass screening technic for childhood exposure to lead.
Am.J.Clin.Pathol.53:967-9 Jun.1970

21. Dhatt P.S.

Urinary amino acids in mental retardation.
Indian J.Pediat.35:469-75 Oct.1968

22. Di Stephano A. et al.

Personal results in screening amino acid diseases by
means of the method of Shriver et al.
Minerva Pediat.22:461-70 Mar.1970

23. Efron M.L.

A simple chromatographic screening test for the de-
tection of disorders of amino acid metabolism.
New.Engl.J.Med.270:1378 1964

24. Efron M.L.

The aminoacidurias
Pediat.Clin.North Amer.14:881-903 Nov.1967

25. Ersser R.S.

Screening for amino acid disorders using prepared
thin layers of cellulose on aluminium foil.
J.Med.Lab.Techn.27:142-53 Apr.1970

26. Farriaux J.P. et al.

Methods of detection of amino acid metabolism anomalies.
Technical aspects and personal results.
Pediatrie 23:479-81 Jun.1968

27. Farriaux J.P. et al.

Difficulties in interpreting a pathological aminoaciduria.

Acta Pediatr. Belg. 22:5-28

1968

28. Fell V. et al.

Ornithinemia, hyperammonemia and homocitrullinuria. A disease associated with mental retardation and possibility caused by defective mitochondrial transport.

Am. J. Dis. Child. 127:752-6

May 1974

29. Foïs A. et al.

Personal experience of organizing a laboratory for the diagnosis of aminoacidopathies.

Riv. Clin. Pediatr. 81:449-65

Jul.-Aug. 1968

30. Fontaine G. et al.

Results of a survey of search of aminoacidopathies in the North of France. A propos of 8,433 children.

Ann. Pediatr. (Paris) 17:487-9

Jun.-Jul. 1970

31. Frimpter G.W.

Aminoacidurias due to inherited disorders of metabolism

N. Engl. J. Med. 289:895-901

Oct. 1973

32. Ganger C.

Rapid screening for aminoacidurias

Am. J. Med. Technol. 37:434-439

1971

33. Giliberti P. et al.

Separation of neutral amino acids, dipeptides and oligopeptides into classes. Application to urine.

J. Chromatogr. 66:261-76

Apr. 1972

34. Goodman S.J. et al.

Antenatal diagnosis of argininosuccinic aciduria.

Clin. Genet. 4:236-40

1973

35.Griffiths M.J.

Implications for clinical implementation of results of metabolic screening for aminoacidopathies in the newborn.

Arch.Dis.Child 46:881

Dec.1971

36.Gründig E.et al.

Diagnostic value of amino acid determination in the clino-chemical laboratory.

Wien.Med.Wochenschr.123:109-11

Feb.1973

37.Gupta P.C.

Urinary excretion of amino acids in mentally retarded children.A study of 150 cases by circular paper chromatography.

Neurol.India 18:17-21

Mar.1970

38.Güttler F. et al.

Urinary phenylalanine excretion in hyperphenylalaninemic children.

Acta Paediat.Scand.62:333-36

1973

39 Guthrie R.et al.

A simple phenylalanin method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants.

Pediatrics 32:338

1963

40.Guthrie R.et al.

Screening for inborn errors of metabolism in newborn infants:a multiple program.

Birth Def.Orig.Art.Ser.4:92

1968

41. Hambræus L. et al.

Arginiosuccinic aciduria. Report of three cases and effect of high and reduced protein intake on the clinical state.

Acta Paediatr. Scand. 63:525-36

Jul. 1974

42. Hambræus L. et al.

Urinary metabolic screening in children with psychoneurological diseases. Evaluation of different screening tests.

Ups. J. Med. Sci. 15: Suppl. 15:1-23

1974

43. Heathcote J.G. et al.

An improved technique for analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose.

II. The quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates.

J. Chromatogr. 43:84-92

Aug. 1969

III. Detection and identification by selective staining

J. Chromatogr. 51:267-75

Sep. 1970

IV. The characterization of small peptides by thin layer and ion chromatography.

J. Chromatogr. 65:397-405

Feb. 1972

V. The quantitative determination of urea in urine

J. Chromatogr. 60:103-9

Aug. 1971

44. Heathcote J.G. et al.

The effect of desalting on the determination of amino acids in urine by thin layer chromatography.

Clin. Chim. Acta 32:457-63

May 1971

45. Heathcote J.G. et al.

Thin layer chromatography in the examination of amino acid metabolism and renal function.

J. Chromatogr. 78:193-200

Apr. 1973

46. Heimer E.P.

Quick paper chromatography of amino acids.

J.Chem.Educ.49:547

Aug.1972

47. Holmgren G.

Urinary metabolic screening of mentally retarded patients from institutions in the northern part of Sweden.

Hum.Hered.23:848-60

1973

48. Humbel R. et al.

A simple method of thin layer chromatography for the identification of argininosuccinic aciduria.

Monatsschr.Kinderheilkd.117:16-7

Jan.1969

49. Humbel R, et al.

Screening test for aspartylglucosaminuria

J.Pediatr.84:456

Mar.1974

50. Hyánek J.

Hyperphenylalanineemia and other hyperaminoacidurias with mental retardation detected by multiple screening.

Cas.Lek.Cesk.111:176-8

1972

51. Hyánek J. et al.

Incidence of phenylketonuria and other inborn errors of the amino acid metabolism in the normal and mentally retarded population.

Rev.Czech.Med.20:18-22

1974

52. Jackson S.H.

Problems in screening infants for defects of amino acid metabolism.

Clin.Biochem.6:15-21

Mar.1973

53. Jorgensen O.S. et al.

A thin layer chromatography study

Danish Med Bull. 17:161-5

Jun. 1970

54. Kato T. et al.

Urinary amino acid patterns in cystinuric families.

Nagoya J. Med. Sci. 36:71-8

Mar. 1974

55. Kovács J.

Ion exchange thin layer chromatographic screening test
for phenylketonuria and other aminoacidemias.

Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung. 14:165-9

1973

56. Krafczyk F. et al.

Simplified thin layer chromatography screening test
for detection of important hyperaminoacidemias.

Clin. Chim. Acta 31:489-91

Feb. 1971

57. Krafczyk F. et al.

A simple thin layer chromatography screening test for
the detection of hyperaminoacidemias.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7:521-4

Sep. 1970

58. Krafczyk F. et al.

Thin layer chromatographic screening test for amino
acid anomalies in urine without desalting using
internal standards.

Clin. Chim. Acta 35:445-51

Dec. 1971

59. Kutter D. et al.

Thin layer chromatography of amino acids in biological
medium. Use for detection and diagnosis of aminoacido-
pathies.

Pharm. Acta Helv. 45:553-63

Sep. 1970

60. Langley D.J.

Two dimensional separation of urinary amino acids by
high voltage paper electrophoresis and chromatography.
J.Med.Lab.Technol.27:298-301 Jul.1970

61. Lato M. et al.

A sensitive chromatographic technique for screening
of amino acid metabolic defects in the newborn.
Clin.Chim.Acta 53:273-80 Jun.1974

62. Laws H.F. et al.

Letter: "Pseudo-cystathioninuria" - a note of caution
about chromatographic diagnosis.
J.Pediatr.84:925 Jun.1974

63. Leaf G. et al.

Amino acid excretion studies in a cystinuric family.
Clin.Chim.Acta 48:5-8 Sep.1973

64. Lemonnier A. et al.

Isolation and identification of a new urinary oxydative
metabolite of homocystine.
Clin.Chim.Acta 33:359-64 Jul.1971

65. Levy H.L.

A simple indirect method of detecting the enzyme de-
fect in histidinemia.
J.Pediatr.75:1056-8 Dec.1969

66. Levy H.L. et al.

Results of a screening method for free amino acids.
II. Urine.
Clin.Biochem.1:208-215 1967

67. Levy H.L. et al.

Massachusetts metabolic disorders screening program.

Technics and results of urine screening.

Pediatrics 49:825-36

Jun. 1972

68. Lines D.R. et al.

Urinary amino acid excretion in phenylketonuric, hyperphenylalaninemic and normal patients.

J. Pediatr. 78:474-80

Mar. 1971

69. Lorentz K. et al.

Staining of amino acids with benzoquinone in paper chromatography.

Anal. Biochem. 38:557-9

Dec. 1970

70. Lutz P.

Diagnostic methods for the detection of amino acid metabolism disorders.

Monatsschr. Kinderheilkd. 121:184-9

May 1973

71. Lyon I.C. et al.

Cystathioninuria in a well baby population.

Acta Paediatr. Scand. 60:324-8

May 1971

72. Martin J.

Neuropathological study of aminoacidurias.

Monogr. Hum. Genet. 6:64-78

1972

73. Menzel K. et al.

Thin layer chromatographic determination of amino acids in urine as a contribution to clinical diagnosis.

Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung. 12:295-304

1971

74. Menzel K. et al.

High voltage electrophoretic and chromatographic separation of amino acids on cellulose thin layer plates.

Z. Med. Labortechn. 13:292-8

1972

75. Mönch E. et al.

Screening for cystinuria and homocystinuria. Manual and semiautomatic quantitative determination of urinary aliphatic compounds with SH-groupes and S-S-bridges.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8:516-9

Sep. 1970

76. Mönch E.

Beeinflussung der Screening-Tests auf angeborene Stoffwechselstörungen durch Medikamente.

Monatsschr. Kinderheilkd. 121:483-4

1973

77. Nielsen H.R.

Occurrence of ninhydrin-positive carbohydrates in thin layer chromatograms of urinary amino acids.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29:213-5

Apr. 1972

78. Palmer T. et al.

Amino acid levels in patients with hyperammonemia and and argininosuccinic aciduria.

Clin. Chim. Acta 52:335-41

May 1974

79. Perry T.L. et al.

Cystathioninuria in two healthy siblings.

New. Eng. J. Med. 278:590-2

Mar. 1968

80. Philpott D.

Thin layer chromatography of trinitrophenyl derivatives of amino acids in urine and plasma.

J. Clin. Path. 23:315-8

May 1970

81. Pillay D.T. et al.
Separation of amino acids by thin layer chromatography.
J.Chromatogr.47:119-23 Feb.1970
82. Pitt D.
Preliminary results of screening tests for metabolic
errors in Australia.
Med.J.Aust.1:28-9 Jan.1970
83. Przyrembel H. et al.
Amino acid excretion of premature infants receiving
different amounts of protein.
Clin.Chim.Acta 49:27-39 Nov.1973
84. Reploh H.
The clinical findings in a patient with nonketonic
hyperglycinemia.
Z.f.Kinderheilkd.114:191-204 1973
85. Rey F. et al.
Diagnosis and treatment of certain errors of amino
acid metabolism.
Cash.Coll.Med.Hop.Paris 9:1021-7 Nov.1968
86. Romano C. et al.
Early detection of aminoacidopathies, with special
reference to the screening program for phenylketonuria
in the region of Liguria.
Minerva Nipiol.20:144-55 Sep-Oct.1971
87. Rosenberg L.E. et al.
Methylmalonic aciduria. An inborn error leading to meta-
bolic acidosis, long-chain ketonuria and intermittent
hyperglycinemia.
New.Eng.J.Med.278:1319-22 Jun.1968

88. Rubio Pérez P.

Determination of urinary amino acids by means of paper chromatography. Its importance in clinical medicine.

Rev. Clin. Esp. 117:227-48

May 1970

89. Ryan E.W.

Sample preparation for chromatography of amino acids.

Am. J. Technol. 39:52-4

Feb. 1973

90. Sabater J.

Specific spot test for homocystinuria in a filter paper saturated with urine.

Clin. Chim. Acta 39:261-2

1972

91. Saifer A.

Rapid screening methods for the detection of inherited and acquired aminoacidopathies.

Adv. Clin. Chem. 14:145-218

1971

92. Saini A.S.

Paper chromatographic separation of amino acids from untreated urinary amino acid chromatograms.

Clin. Chim. Acta 31:482-4

Feb. 1971

93. Saini A.S.

Some further observations on paper chromatographic separation of amino acids from untreated urine samples.

Indian J. Med. Res. 59:903-5

Jun. 1971

94. Sansò G. et al.

Chromatographic identification of cysteine, also in presence of cystine and other amino acids.

Boll. Chim. Farm. 109:266-70

Apr. 1970

95.Schreier K. et al.

Paper chromatographic studies of amino acid excretion
in urine of brain-injured children.

Monatsschr.Kinderheilkd.117:13-6

Jan.1969

96.Schön R. et al.

Routine thin layer chromatography in 25 000 newborn
infants.Comparison with Guthrie tests.

Z.Kinderheilkd.3:223-32

1971

97.Scriver C.R. et al.

Application of a simple micromethod for the screening
of a plasma for a variety of aminoacidopathies.

Lancet 2:234

1964

98.Scriver C.R. et al.

Amino acid metabolism and its disorders.

Major Probl.Clin.Pediatr.10:1-478

1973

99.Sietti C.

Paper chromatography in the detection of aminoacido-
pathies.

Minerva Pediatr.23:2123-4

Dec.1971

100.Sietti C.

Chromatographic analysis in the diagnosis of metabolic
aminoacidopathies.

Minerva Pediatr.23:2125-8

Dec.1971

101.Simon K.H.

Simplified thin layer chromatography of the amino acids
in blood and urine.

Med.Monatsschr.26.535-7

Nov.1972

102.Spaeth G.L. et al.

Hereditary tyrosinemia.General discussion:screening aspects.

Canad.Med.Ass.J.97:1096-8

Oct.1967

103.Spaeth G.L. et al.

Prevalence of homocystinuria among mentally retarded: evaluation of a specific screening test.

Pediatrics 40:586-9

Oct.1967

104.Spinella C.J.

Two dimensional paper chromatographic determination of amino acids in urine.

Clin.Chem.15:1011-6

Oct.1969

105.Stegink L.D. et al.

Ampicillin and amino acid chromatography.

J.Pediatr.81:1214-5

Dec.1972

106.Stoppoloni G.

Detection of amino acid metabolism inborn errors in neonatal age.

Pediatrics (Napoli) 82:79-95

Mar.1974

107.Stuber A.

Screening tests and chromatography for the detection of inborn errors of metabolism.

Clin.Chim.Acta 36:309-13

Feb.1972

108.Stübchen-Kirchner H.

An improved differentiation of amino acids with ninhydrin.

Hoppe Seyler Z.Physiol.Chem. 349:1049-54

1963

109.Szeinberg A. et al.

Screening program for early detection of phenylketon-
uria and other disorders of phenylalanine metabolism in
the newborn in Israel.

Harefuah 78:369-71

Apr.1970

110.Tanaka K.

Letter:Aminoacidurias and organic acidurias
N.Engl.J.Med.290:407-8

Feb.1974

111.Thalhammer O. et al.

Histidinemia detected by newborn screening using
Guthrie's method.

Arch.Dis.Child 45:820

Dec.1970

112.Thalhammer O. et al.

Histidinemia:detection by routine newborn screening
and biochemical observations on three unrelated cases.
Z.Kinderheilkd.109:279-92

1971

113.Thalhammer O. et al.

Occurence of histidinemia:results of a mass screening
in 48 000 newborn infants.

Monatsschr.Kinderheilkd.119:357-60

Jul.1971

114.Thalhammer O. et al.

The Austrian screening programme for early detection
of inborn errors of metabolism.An evaluation of 5
years.

Wien.klin.Wschr.84:41

1972

115.Thalhemmer O.

Early detection of congenital metabolic anomalies.

Klin.Paediatr.185:81-90

Mar.1973

116. Thalhammer O. et al.
Histidinemia: biochemical anomaly or disease?
Monatsschr. Kinderheilkd. 121:201-4 May 1973
117. Tippet P.A. et al.
Screening for aminoaciduria: a critical evaluation of
four techniques and a survey of a mentally retarded
population.
Aust. Paediatr. J. 8:255-63 Oct. 1972
118. Turner B. et al.
Amino acid excretion in infancy and early childhood.
A survey of 100 000 infants.
Med. J. Aust. 1:11-14 Jan. 1970
119. Turner B. et al.
Amino acid excretion in infancy and early childhood.
A survey of 200 000 infants.
Med. J. Aust. 1:62-5 Jan. 1972
120. Turner B. et al.
The Wales register of cystinurics: First report January
to December, 1971.
Med. J. Aust. 2:1005 1973
121. Urner U.
Multiphasic testing for the diagnosis of genetic
disorders of amino acid and carbohydrate metabolism,
a pilot study.
Dtsch. Gesundheitsws. 28:49-53 Jan. 1973
122. Vercaemst R. et al.
Screening for hyperaminoacidemias in newborns by
thin layer chromatography on DEAE-cellulose.
Acta Paediatr. Belg. 27:334-47 1973

123. Vlassak W.H.

Identification of amino acids by thin layer chromatography.

J.Pharm.Belg.22:425-30

Nov-Dec.1967

124. Wilcken B. et al.

Detection of abnormal sulphur containing amino acid excretion in a mass urine screening programme.

Med. J.Aust.1:1193-5

Jun.1972

125. Wilcken B. et al.

Screening for metabolic diseases in New South Wales.

Med.J.Aust.1:1129

1973

Lebenslauf

Am 2.9.1950 wurde ich, Marlene Baubin, geb. Fertl, als Tochter des Augenarztes Dr. Walter Fertl und seiner Frau Brigitte, geb. Oldenbourg, in München geboren.

1956-1960 Volksschule am Bayernplatz in München

1960-1969 Willi-Graf-Gymnasium (neusprachlicher Zweig) in
München

1969 Reifeprüfung

1969/70 ein Semester Studium der Geschichte und Musik in
München

1970 Studium der Medizin in Freiburg i.Br.

1971 Vorphysikum

1973 Physikum

1973-1974 Studium der Medizin in Wien

1974-1976 Studium der Medizin in München

1976 Staatsexamen

